

総 説 (第33回徳島医学会賞受賞論文)

UCP3と Hax-1の相互作用によるミトコンドリアのカルシウム濃度の調節

春 名 真里江¹⁾, 平 坂 勝 也²⁾, 富 田 知 里¹⁾, 安 倍 知 紀¹⁾, 真 板 綾 子¹⁾,
近 藤 茂 忠¹⁾, 二 川 健¹⁾

¹⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体栄養学

²⁾長崎大学水産学部食品栄養学

(平成26年11月14日受付) (平成26年11月20日受理)

はじめに

生体内においてカルシウムシグナル伝達は発達・神経伝達物質の放出・筋収縮・代謝・オートファジーなどを調節しており, 生命を維持するうえで非常に重要である¹⁾。特に, ミトコンドリアのカルシウム恒常性は多くの生体反応を調節し, 細胞の生死を決定することが明らかになっている²⁾。ミトコンドリアは, ほとんどの哺乳類の細胞内で, ATP 合成や活性酸素種 (ROS) 産生, アポトーシスと同様にカルシウム循環において重要な役割を果たしている。ミトコンドリアマトリックス内に生理的範囲でカルシウムイオンが増加すると, ATP 合成, ROS 産生に関わる酵素が活性化され機能するが³⁻⁶⁾, 過剰な流入は, これらの酵素の不活化を引き起こし, ミトコンドリアの機能障害を招く¹⁾。実際に, 老化や機械的ストレスなどの刺激によってミトコンドリアのカルシウムイオン濃度上昇によって引き起こされたミトコンドリアの機能障害は, 筋萎縮に繋がることが報告されている^{6,7)}。

ミトコンドリアのカルシウムと UCP3

近年では, 脱共役蛋白質 UCP3がミトコンドリアのカルシウム取り込みを助長することが示唆されている^{8,9)}。UCPs は, ミトコンドリアのプロトン勾配を消散するミトコンドリア内膜陰イオン輸送蛋白質のサブファミリーを構成している¹⁰⁾。マウスにおいては, 熱産生調節に重

要な役割を果たす UCP1がほぼ褐色脂肪組織にのみ発現する。一方, 1997年に初めて UCP1の相同体として同定された UCP3は骨格筋や心筋に特異的に発現する^{11,12)}。UCP3は, プロトンリーク以外にもミトコンドリアにおける ROS 産生や脂肪酸の酸化を制御することなどが多くの生理的作用を有することが知られている¹³⁻¹⁵⁾。本研究では, UCP3がミトコンドリアのカルシウム取り込みを制御するメカニズムについて検討した。

UCP3と Hax-1のミトコンドリアにおける共局在

われわれは酵母ツーハイブリッドスクリーニングより, UCP3と HS associated protein X-1 (Hax-1) が結合することを見出した。Hax-1は, 細胞質やミトコンドリアに局在する抗アポトーシス蛋白質である。両者の結合は *in vitro* ではヒト由来 HEK293細胞, マウス由来 C2C12筋細胞において, そして, *in vivo* では C57BL/6マウス (10週齢) において確認した。また, 免疫染色の結果から, UCP3, Hax-1がそれぞれ Mitotracker red と共局在すること, つまり UCP3と Hax-1がミトコンドリアにおいて共局在を示すことを見出した。このことから, UCP3と Hax-1がミトコンドリアにおいて相互作用していると考えた。さらに, ミトコンドリアにおける, より詳細な結合位置を検討するため, ミトコンドリア内局在アッセイを行った結果, UCP3と Hax-1は内膜近辺に共局在することが示唆された。

UCP3 loop2ドメインおよび Hax-1C 末端を介した結合

UCP3と Hax-1の結合について、さらに詳細な検討を行った。まず、結合部位を決定するため、UCP3変異体と Hax-1リコンビナント蛋白質を作製し、結合アッセイを行った。まず、UCP3の部分的欠損変異体を用いた結合アッセイの結果、UCP3 loop2欠損変異体は Hax-1との結合能を持たないことが分かった。このことから、Hax-1との結合には UCP3の loop2ドメインが必要であることが明らかとなった。次に、Hax-1における結合部位を同定するため、N 末側に GST 蛋白質を組み込んだリコンビナント蛋白質を作製した。この実験では、Hax-1を5つの領域に区分し、それぞれの領域を発現する蛋白質を作製することで、どの領域が結合に重要であるかを検討した。結合アッセイの結果から、Hax-1の C 末部分が UCP3と結合する部位であることを見出した。さらに、UCP3 loop2部分のリコンビナント蛋白質も作製し、それが、Hax-1の C 末部分リコンビナント蛋白質と結合をしていることを確認した。これらの結果より、Hax-1の C 末部分は UCP3の親水性ドメインである loop2と結合することが明らかとなった。

これまでの研究報告から、UCP3と Hax-1の結合は、カルシウムイオンによって仲介されていることが考えられる^{8,9)}。この仮説を証明するために、UCP3-Hax-1結合におけるカルシウムイオンの必要性を検討した。結合アッセイ反応液にカルシウムを添加あるいは除去するこ

とで、結合がどのように変化するかを検討した。興味深いことに、カルシウムイオン存在下では Hax-1が UCP3と結合することが確認できたが、カルシウムイオン非存在下では結合しなかった。さらに、イオノマイシンを用いて時間依存的に細胞内のカルシウム濃度を上昇させて、結合アッセイを行った。UCP3と Hax-1ともに強発現させた HEK293細胞において、UCP3-Hax-1の相互作用は細胞内のカルシウム濃度増大に伴って強くなった。以上のことから、UCP3と Hax-1の結合はカルシウムイオン依存的であることが明らかとなった。つまり、カルシウムが無い状態では両者は結合しておらず、カルシウムが存在すると結合できることが示唆された。

UCP3-Hax-1結合のミトコンドリアにおけるカルシウム取り込み制御作用

これまでに、UCP3がミトコンドリアへのカルシウム取り込みを促進するという報告がなされていた⁸⁾。これと一致して、われわれは内在性 UCP3蛋白質が発現していない C2C12筋芽細胞において UCP3を強発現させると、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みが有意に増加することを確認した (図1)。しかしながら、ミトコンドリアのカルシウム取り込みに重要であると考えられる UCP3 loop2部分以外の欠損変異体を強発現させても、ミトコンドリアのカルシウム取り込みはコントロールと比較して変化がなかった。これは UCP3の loop2ドメ

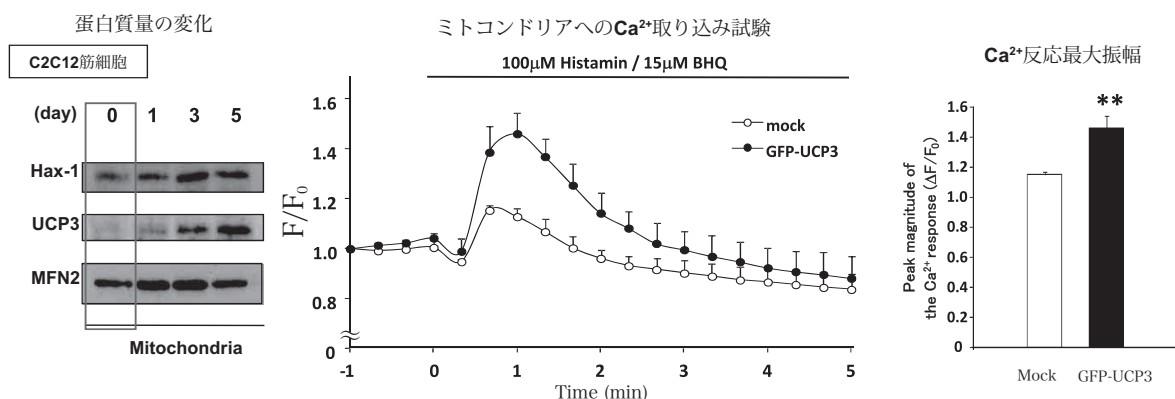


図1 UCP3によってミトコンドリアのカルシウム取り込みが促進される。内在性に Hax-1は発現しているが UCP3が発現していない C2C12筋芽細胞を用いた。GFP タグ付き UCP3を強発現させると、コントロールと比較して、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みが有意に増加することを確認した。これによって、UCP3によってミトコンドリアのカルシウム取り込みが促進されることが示唆される。

ンが、ミトコンドリアのカルシウム取り込みを促進するうえで重要な役割を果たしていることを示している。ここで UCP3と Hax-1の相互作用が、ミトコンドリアのカルシウム取り込みに与える影響について検討した。UCP3と Hax-1の両方が内在性に発現している C2C12筋管細胞において Hax-1をノックダウンすると、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みの有意な増加がみられた。しかし、UCP3が発現していない C2C12筋芽細胞において Hax-1をノックダウンしても、ミトコンドリアのカルシウム取り込みに影響はなかった (図2)。このことから、UCP3によってミトコンドリアのカルシウム取り込みが促進されるが、Hax-1との相互作用によってその促進作用が抑制されることが示唆された。これまでの実験結果は、UCP3と Hax-1の相互作用がミトコンドリアのカルシウム濃度を感知してカルシウム依存的に起こり、その結果として、ミトコンドリアのカルシウム取り込みを調節していることを強く示唆している (図3)。

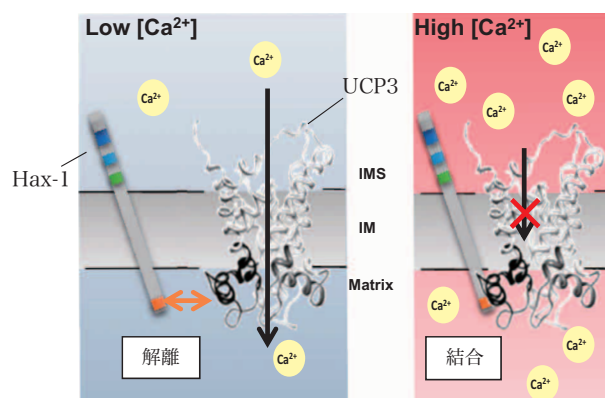


図3 UCP3-Hax-1の結合によってミトコンドリアのカルシウム濃度が調節される。
実験結果から、カルシウムが無い状態ではUCP3と Hax-1は結合しておらず、カルシウムが存在すると結合するようになる。また、UCP3はミトコンドリアのカルシウム取り込みを促進する作用があり、Hax-1はその取り込みを制御することが示唆される。つまり、細胞内のカルシウム濃度が上昇すると、両蛋白質は結合し、ミトコンドリアのカルシウム取り込みを制御していると考えられる。

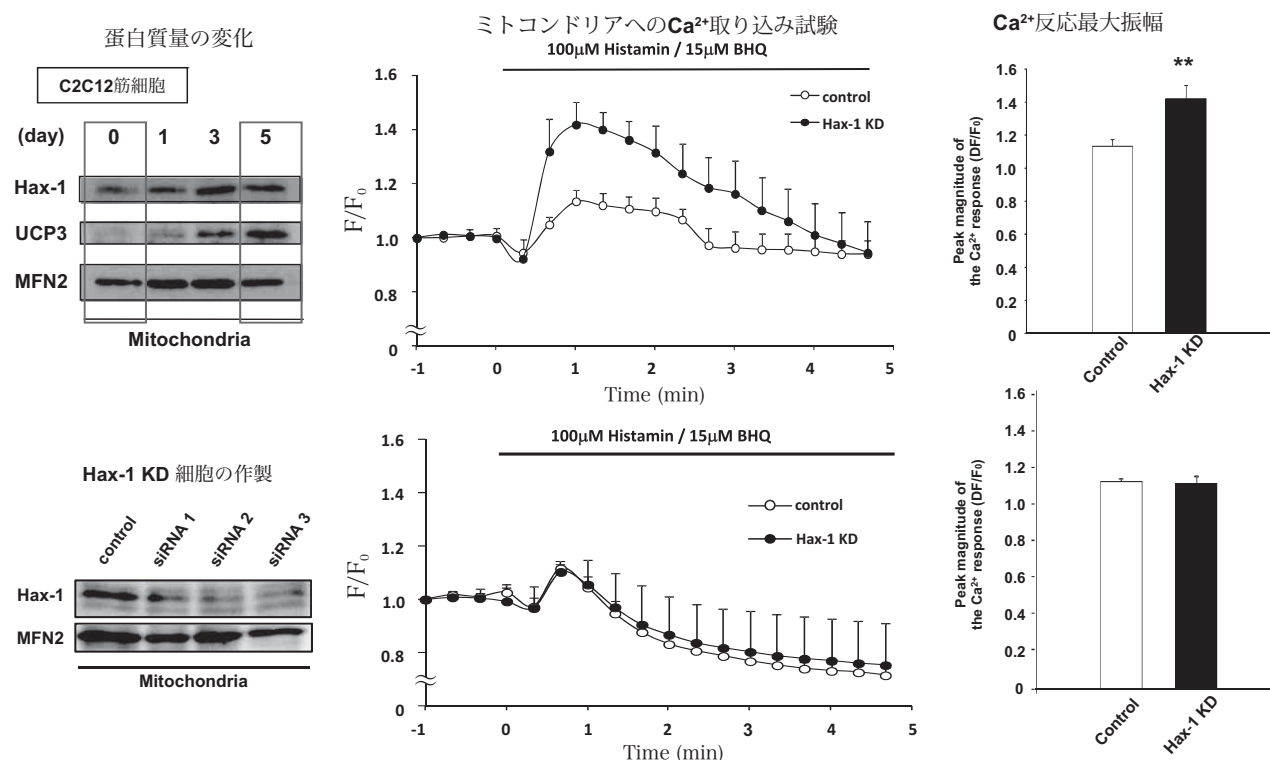


図2 UCP3依存的なミトコンドリアへのカルシウム取り込みを Hax-1が制御する。
上：UCP3と Hax-1の両方が内在性に発現している C2C12筋管細胞 (分化5日目) を用いた。Hax-1の siRNA はノックダウン効率の良かった siRNA3を使用した。Hax-1をノックダウンするとミトコンドリアへのカルシウム取り込みの有意な増加がみられた。
下：Hax-1は発現しているがUCP3が発現していない C2C12筋芽細胞 (分化0日目) を用いた。Hax-1をノックダウンしても、ミトコンドリアのカルシウム取り込みに影響はなかった。
これらのことから、Hax-1はUCP3依存的なミトコンドリアのカルシウム取り込みを制御することが示唆された。

加齢による筋萎縮との関連

最後に、加齢における筋萎縮での UCP3-Hax-1 相互作用の役割を検討した。これまでに、老齢マウス筋でのミトコンドリア内カルシウム濃度異常が、ミトコンドリアの機能障害と ROS 産生増大の原因になることが報告されていた⁶⁾。老齢筋においては慢性的に筋小胞体からカルシウムが漏れ出し、それをミトコンドリアが取り込むことによりミトコンドリアのカルシウム濃度増大が引き起こされることが示唆されている。そこで、われわれは UCP3 と Hax-1 の相互作用が崩壊することにより、ミトコンドリアの機能障害に起因するサルコペニアが引き起こされると考えた。若齢マウス長趾伸筋線維において、ミトコンドリアのカルシウム取り込みは時間依存的に徐やかに上昇した。一方、老齢マウス長趾伸筋線維では、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みは急激に上昇した。さらに前脛骨筋の免疫染色により、老齢マウス筋では Hax-1 が細胞質部位に多く局在しており、ミトコンドリアから細胞質へ移動していることが示唆された (図 4)。このことは、老齢マウス筋では Hax-1 の局在異常により UCP3 との相互作用が弱まることで、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みが制御できなくなっていることを示唆している。加齢による筋萎縮において、UCP3

と Hax-1 の相互作用が新規治療法開発の鍵を握っているかもしれない。

おわりに

これらの研究結果から、哺乳動物の筋肉にあるミトコンドリアにおいて、UCP3-Hax-1 複合体がミトコンドリアのカルシウム取り込み制御に影響を及ぼすという新たな知見を得た。さらに、老齢マウスを用いた実験結果から、UCP3-Hax-1 相互作用が加齢による筋萎縮の治療標的となり得ることが示された。

文 献

- 1) Randal, J., Kaufman, Jyoti, D., Malhotra, *et al.*: Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1843(10): 2233-9, 2014
- 2) Giacomello, M., Drago, I., Pizzo, P., Pozzan, T., *et al.*: Mitochondrial Ca^{2+} as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ.*, 14(7): 1267-74, 2007
- 3) Graier, W. F., Trenker, M., Malli, R.: Mitochondrial Ca^{2+} , the secret behind the function of uncoupling

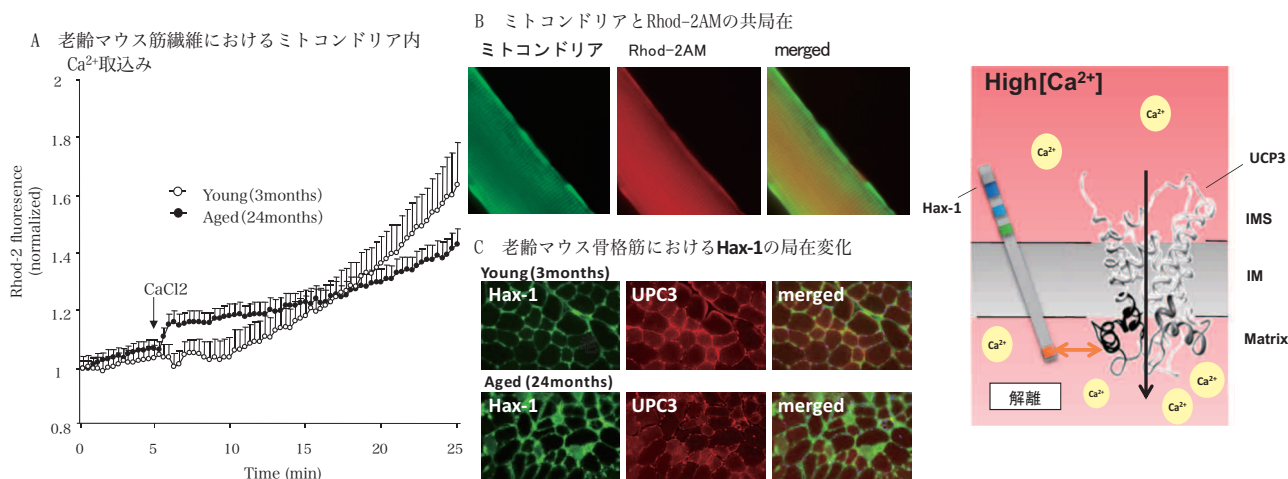


図 4 加齢によって UCP3-Hax-1 結合が破綻する (仮説)。老齢マウス (24 ヶ月齢) および若齢マウス (3 ヶ月齢) の長趾伸筋線維を用いて、ミトコンドリアのカルシウム取り込みを測定した。Rhod2-AM はミトコンドリアのカルシウム蛍光プローブであり、これを利用した。比較すると、老齢マウスの方ではミトコンドリアへのカルシウム取り込みは急激に上昇した。さらに前脛骨筋の免疫染色により、老齢マウスでは Hax-1 が細胞質部位に多く局在しており、ミトコンドリアから細胞質へ移動していることが示唆された。これらのことから、老齢マウスでは、Hax-1 の局在異常により UCP3 との相互作用が弱まることで、ミトコンドリアへのカルシウム取り込みが制御できなくなっていることを示唆する。

- proteins 2 and 3 ? Cell Calcium, **44** : 36-50, 2008
- 4) Hopper, R. K., Carroll, S., Aponte, A. M., Balaban, R. S., *et al.* : Mitochondrial matrix phosphoproteome : effect of extra mitochondrial calcium. Biochemistry, **45**(8) : 2524-36, 2006
 - 5) Rizzuto, R., Duchen, M. R., Pozzan, T. : Flirting in little space : the ER/mitochondria Ca^{2+} liaison. Sci STKE. 2004(215) : re1. Review, 2004
 - 6) Andersson, D. C., Betzenhauser, M. J., Reiken, S., Marks, A. R., *et al.* : Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. Cell Metab., **14**(2) : 196-207, 2004
 - 7) Csukly, K., Ascah, A., Matas, J., Burelle, Y., *et al.* : Muscledenervation promotes opening of the permeability transition pore and increases the expression of cyclophilin D. J. Physiol., **574**(Pt 1) : 319-27, 2006
 - 8) Trenker, M., Malli, R., Fertschai, I., Graier, W. F., *et al.* : Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca^{2+} uniport. Nat. Cell Biol., (4) : 445-52. Epub(2007)Mar11. Erratum in : Nat. Cell Biol., **10**(11) : 1371, 2008
 - 9) Waldeck-Weiermair, M., Duan, X., Naghdi, S., Graier, W. F., *et al.* : Uncoupling protein 3 adjusts mitochondrial Ca^{2+} uptake to high and low Ca^{2+} signals. Cell Calcium., **48**(5) : 288-301, 2010
 - 10) Azzu, V., Brand, M. D. : The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. Trends Biochem. Sci., **35** : 298-307, 2010
 - 11) Liu, X., Rossmeisl, M., McClaine, J., Kozak, L. P., *et al.* : Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice. J. Clin. Invest., **111**(3) : 399-407, 2003
 - 12) Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Giacobino, J. P., *et al.* : Uncoupling protein-3 : a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. FEBS Lett., **408**(1) : 39-42, 1997
 - 13) Hirasaka, K., Lago, C. U., Kenaston, M. A., Mills, E. M., *et al.* : Identification of a redox-modulatory interaction between uncoupling protein 3 and thioredoxin 2 in the mitochondrial intermembrane space. Antioxid. Redox Signal., **15**(10) : 2645-61, 2011
 - 14) Schrauwen, P., Saris, W. H., Hesselink, M. K. : An alternative function for human uncoupling protein 3 : protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. FASEB J., **15**(13) : 2497-502, 2001
 - 15) Krauss, S., Zhang, C. Y., Lowell, B. B. : The mitochondrial uncoupling-protein homologues. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **6**(3) : 248-61. Review, 2005

The interaction between uncoupling protein 3 and Hax-1 is regulated by calcium ion in mitochondria

Marie Haruna¹⁾, Katsuya Hirasaka²⁾, Chisato Tomita¹⁾, Tomoki Abe¹⁾, Ayako Ohno¹⁾, Shigetada Teshima-Kondo¹⁾, and Takeshi Nikawa¹⁾

¹⁾Department of Nutritional Physiology, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima, Tokushima, Japan

²⁾Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

SUMMARY

Mitochondrial Ca^{2+} plays an important role in the regulations of various cellular functions. Uncoupling protein 3 (UCP3) is primarily expressed in the inner membrane of skeletal muscle mitochondria. Recently, it has been reported that UCP3 is associated with Ca^{2+} uptake into mitochondria. However, the mechanisms by which UCP3 regulates mitochondrial Ca^{2+} uptake are not well understood. Here we report that UCP3 interacts with HS-1 associated protein X-1 (Hax-1), an anti-apoptotic protein that is localized in mitochondria, which is involved in cellular responses to Ca^{2+} . The hydrophilic sequences within the loop2, matrix-localized hydrophilic domain of mouse UCP3 are necessary for binding to Hax-1 of the C-terminal domain in adjacent to mitochondrial innermembrane. Interestingly, interaction of these proteins occurs the calcium-dependent manner. Moreover, NMR spectrum of the C-terminal domain of Hax-1 was dramatically changed by removal of Ca^{2+} , suggesting that the C-terminal domain of Hax-1 underwent a Ca^{2+} -induced conformation change. In the Ca^{2+} -free states, C-terminal Hax-1 didn't change the structure, suggesting that Ca^{2+} binding may induce the change of protein structure of Hax-1 C-terminus. These studies identify a novel UCP3-Hax-1 complex regulates the influx of Ca^{2+} into mitochondria. Thus, the efficacy of UCP3-Hax-1 in mitochondrial calcium regulation may provide a novel therapeutic approach against mitochondrial dysfunction-related disease.

Key words : mitochondria, calcium ion